

PEPTIDE COMPOSITION HAVING HIGH GLUTAMINE CONTENT, ITS PRODUCTION AND ENTERAL FEEDING AGENT

Patent Number: JP5236909
Publication date: 1993-09-17
Inventor(s): ARAI SOICHI; others: 02
Applicant(s): SNOW BRAND MILK PROD CO
Requested Patent: ☐ JP5236909
Application: JP19920078260 19920228
Priority Number(s):
IPC Classification: A23L1/305; A61K37/02; C12P21/06
EC Classification:
Equivalents: JP2524551B2

Abstract

PURPOSE: To obtain the subject composition effective in suppressing the degeneration of the mucous membrane of the small intestine, having excellent stability and glutamine-absorbency and useful as a raw material for infusion, etc., by decomposing a specific protein with a proteinase, removing free amino acids and collecting a peptide fraction.

CONSTITUTION: A protein containing $\geq 20\%$ of glutamine as a constituent amino acid is decomposed with one or more kinds of proteinases. Free amino acids are removed from the decomposition product and a peptide fraction having molecular weight distributing within the range of 131-1,141 dalton (determined by gel permeation) is collected to obtain the objective composition containing glutamine or glutamic acid in an amount accounting for $\geq 40\%$ of the constituent amino acids. An enteral feeding agent can be prepared by compounding the composition as a glutamine-source.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平5-236909

(43) 公開日 平成5年(1993)9月17日

(51) Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 2 3 L 1/305				
A 6 1 K 37/02		8314-4C		
C 1 2 P 21/06		8214-4B		

審査請求 未請求 請求項の数6(全11頁)

(21) 出願番号	特願平4-78260	(71) 出願人	000006699 雪印乳業株式会社 北海道札幌市東区苗穂町6丁目1番1号
(22) 出願日	平成4年(1992)2月28日	(72) 発明者	荒井 綜一 神奈川県横浜市神奈川区七島町38
		(72) 発明者	渡辺 道子 東京都東村山市秋津町4-42-19
		(72) 発明者	大森 俊弘 栃木県宇都宮市築瀬町347-1 コーポシ ュベステル201
		(74) 代理人	弁理士 藤野 清也

(54) 【発明の名称】 グルタミン含量の高いペプチド組成物、その製造方法及び経腸栄養剤

(57) 【要約】

【構成】 グルテンあるいはゼインをプロテアーゼで処理して得られるグルタミンもしくはグルタミン酸を構成アミノ酸の40%以上含有し、分子量が131~1141ダルトン(ゲル濾過法による)の範囲に分布するペプチド組成物。

【効果】 小腸粘膜退化抑制機能を有し、経腸栄養剤あるいは輸液の成分として利用することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 グルタミンもしくはグルタミン酸を構成アミノ酸の40%以上含有するペプチド組成物。

【請求項2】 ペプチド組成物中の遊離アミノ酸含量が10%以下であり、ペプチドの平均鎖長がアミノ酸2乃至5である請求項1記載のペプチド組成物。

【請求項3】 グルテンまたはゼインを酸性プロテアーゼ及び中性プロテアーゼで順次加水分解し、加水分解物をクロマトグラフにかけて得ることができる次の性質を有し、ジペプチドからペンタペプチドより構成され、それ以外に少量の遊離アミノ酸を含むペプチド組成物。

① 平均分子量約 200ダルトン（ゲル濾過法による）

② 分子量分布、その大部分が分子量 131~1411ダルトンの範囲に分布しており、分子量 200ダルトン付近にピークを有する（ゲル濾過法による）。

③ 加水分解後のアミノ酸の40%以上がグルタミン酸として定量される。

④ 遊離アミノ酸量が10%以下で、かつ遊離グルタミン酸が5%以下である。

⑤ 小腸粘膜退化抑制機能を有する。

【請求項4】 グルタミンを構成アミノ酸として20%以上含有する蛋白質を、一種以上の蛋白質分解酵素により分解し、ついで遊離アミノ酸を除去し、ペプチド画分を分取することを特徴とするグルタミンもしくはグルタミン酸を構成アミノ酸の40%以上含有するペプチド組成物の製造方法。

【請求項5】 蛋白質がグルテンもしくはゼインである請求項4記載の製造方法。

【請求項6】 請求項1記載のペプチド組成物をグルタミン供給源として配合し、小腸粘膜退化抑制効果を有することを特徴とする経腸栄養剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、グルタミンもしくはグルタミン酸を構成アミノ酸の40%以上含有するペプチド組成物、このペプチド組成物の製造方法及びこの組成物を配合した経腸栄養剤に関する。本発明のペプチド組成物は、経腸栄養剤などの窒素源として、また輸液原料として有用である。

【0002】

【従来の技術】外科手術後の栄養補給方法や各種疾患の栄養療法として静脈栄養と経腸栄養をあげることができる。外科手術などによる異化機能が高進した場合には、高カロリー栄養を補給し、生体の回復を促進させる療法が一般的に行われている。このための栄養組成物として、消化吸収に負担のかからないものが使用される。その代表的なものとして、高カロリー輸液があげられる。高カロリー輸液はアミノ酸の溶解液と高濃度の糖液を中心静脈を経由して連続的に投与される。経腸栄養剤としては消化吸収に負担の掛からないように設計された成分

栄養剤が用いられる。これは、栄養成分としてアミノ酸混合物、デキストリン、トリグリセリド、無機塩、ビタミン混合物からなり、消化吸収の負担が、殆どないといわれている。また窒素源として蛋白質を酵素加水分解したペプチドを用いた成分栄養剤も市販されている。

【0003】これらの高カロリー輸液や成分輸液のアミノ酸組成については種々の配合が検討されている。特に、必須アミノ酸については種々の研究がなされており、病態に応じ特定のアミノ酸を増減させた組成が提案されている。しかし非必須アミノ酸についてはこのような検討は殆どなされていなかった。最近、非必須アミノ酸についても検討がおこなわれ、アルギニンやグルタミンの添加が検討されている。しかしグルタミンは非常に不安定であり、製剤学上の問題があり、また必要量についても明確な基準がなく、上述の成分栄養剤や高カロリー輸液のアミノ酸組成としてグルタミンの代用として一般にはグルタミン酸を用いて済ませており、グルタミンを強化した製品は未だ提供されていない。

【0004】しかし、アミノ酸の代謝に関する最近の研究には目ざましいものがあり、グルタミンの重要性があらため明らかにされつつある。特に各種侵襲時やストレス時における窒素平衡の改善や、創傷治癒効果、抗潰瘍効果、完全静脈栄養時の消化管粘膜萎縮の予防効果など、外科手術後の栄養剤としては欠くことのできない作用を有していることが判明している。このため輸液中にグルタミンを添加する試みがなされている。

【0005】これらの輸液に添加するグルタミンとしては、結晶グルタミンやアシル化グルタミンの使用が提案されている。また特開平2-119762号公報にはL-グルタミン残基を含むトリペプチドあるいはジペプチドの使用が提案されている。輸液に使用する窒素源としてはアミノ酸が一般的に使用されており、このようなアミノ酸誘導体やジペプチドを使用することには問題はないと考えられる。しかし経腸栄養剤として使用する場合には、低分子の化合物が高濃度に存在すると浸透圧が高くなりしばしば下痢を引き起こすことが指摘されている。またアミノ酸や低分子のペプチドは刺激味があり、経口投与を行う場合に抵抗があることが指摘されている。

【0006】

【解決しようとする課題】本発明者らは、外科手術後や疾患時に投与する栄養剤に添加するグルタミン製剤について検討を行った結果、製剤学的に安定で、かつ浸透圧への影響の少ないグルタミンを高濃度にふくむペプチド組成物を見だし、本発明を完成するに至った。従って、本発明は、グルタミンもしくはグルタミン酸を構成アミノ酸の40%以上含有するペプチド組成物、このペプチド組成物の製造方法及びこの組成物を配合した経腸栄養剤に関する。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明により提供される

グルタミンを高度に含むペプチド組成物は下記の特性値により特定される。

① ペプチド組成物中のグルタミンもしくはグルタミン酸含量: 加水分解後、アミノ酸を定量した場合構成アミノ酸の40%以上がグルタミン酸として定量される。

② 遊離アミノ酸量: 10%以下でかつ遊離グルタミンが5%以下である。

③ 平均分子量: 約200

④ 分子量分布: ゲル濾過による分子量分布が131~1411の範囲に分布し、200付近にピークを有する。

【0008】このような特性を有するペプチド組成物はこれまで得られておらず、本発明により初めて提供されるものである。本発明ペプチド組成物を得るためには、グルタミンを蛋白質の構成アミノ酸として、高度に含有する蛋白質を特定条件下で酵素分解し、さらに分子量分画を行うことにより得ることができる。グルタミンは通常の食品中にも大量に含まれており、蛋白質構成アミノ酸の20%以上であるものが好ましいが、特に、小麦蛋白質であるグルテンやトウモロコシ蛋白質であるゼイン、乳蛋白であるカゼインなどに比較的多く含有されており、このような蛋白質を原料とすることが特に好ましい。原料の入手や、供給の面からみるとグルテンを用いることが好ましい。

【0009】グルテンはその全アミノ酸配列がcDNA配列から明らかとなっている【ニュウクレイック アシド リサーチ(Nucleic Acid Res), 13, 8729, (1985)】が、グルタミンとグルタミン酸の総和のうち96%がグルタミンであり、原料として特に適している。また酸加水分解によりアミノ酸を分析するとグルタミンはグルタミン酸として定量されるため、グルタミン酸を指標とすることにより、グルタミン量を正確に把握できる利点を有する。また原料とする蛋白質は粗製品であっても精製品であっても使用することができる。

【0010】蛋白質濃度を0.5~10%濃度になるように水に溶解もしくは懸濁させ、酵素処理を行う。酵素としては、酸性プロテアーゼであればどのようなものでも使用できるが、一般には微生物プロテアーゼ、もしくは動物プロテアーゼが好ましい。微生物プロテアーゼとしては真菌プロテアーゼが例示できる。真菌プロテアーゼとしてはラビダーゼ(武田化学製)、モルシン(シグマ製)などが、また動物プロテアーゼとしてはペプシンなどが例示できる。これ以外の酵素であっても酸性プロテアーゼであれば使用できる。酵素を上記の水溶液に添加し酵素分解処理を行う。使用する酵素の至適条件下で処理を行うが、グルテンを基質とした酵素処理では、モルシンが低分子ペプチドの生産に特に適していることが確認されている。

【0011】グルテンを基質とした場合、酵素/基質比を1:100、1%酢酸溶媒中で37℃、24時間処理を行い、ペプチド組成物を含む溶液をえることができる。反応終

了後、加熱処理等により酵素反応を停止させ、ゲル濾過により分子量分画を行い、本発明のペプチド組成物を分画するか、あるいはさらに酵素処理を行い、ペプチド組成物の分子量を一定の大きさに調整する。

【0012】本発明においては、グルテンを原料としてモルシンにより酵素分解処理を行った場合、さらに中性プロテアーゼにより酵素処理を行うことが好ましい。酸性プロテアーゼの処理をおこなった溶液を、アルカリたとえば炭酸水素ナトリウム溶液などによりpHを中性にし、中性プロテアーゼを添加して酵素処理を行う。使用する酵素としては放線菌プロテアーゼ、特にアクチナーゼ(科研製薬製)などが特に好ましい。グルテンを基質とした場合、酵素/基質比を1:100、pH7 溶液中で37℃、24時間処理を行い、ペプチド組成物を含む溶液を得ることができる。反応終了後、酵素を失活させた後、ゲル濾過や吸着クロマトグラフィーを用いて遊離アミノ酸を除去し、ペプチド画分のみを得ることができる。ペプチドの分画については、ペプチド鎖長2~5の大きさのものを分離できるような担体であればどのようなものでも使用できる。

【0013】ペプチド組成物は溶液のまま、あるいは凍結乾燥や噴霧乾燥等の処理により粉末とすることができる。このようにして得られたペプチド組成物は単独あるいは、アミノ酸配合の経腸栄養剤に使用することができる。特に本発明組成物を、組成中に1~5%添加することにより、小腸粘膜細胞の退化を抑制することができる。特公平51-26490号公報にはアミノ酸混合物を窒素源とする栄養組成物が開示されている。このような組成物のグルタミンの供給源として本発明組成物を使用することが可能である。配合にあたっては、グルタミンとして供給される量のすべてを本発明のペプチド組成物に置き換えることができるし、また蛋白質を窒素源とする経腸栄養剤においては、グルタミン強化量に相当する量だけ本発明のペプチド組成物を添加することで、小腸粘膜の退化を抑制することができる。

【0014】以下に実施例、実験例を示し本発明をさらに詳細に説明する。

【実施例1】

グルタミンを高度に含有するペプチド組成物の製造

① 原料蛋白質の調製

小麦グルテン(ナカライテスク製)10gをエーテルで脱脂し、エーテルを除去後、1%酢酸(200ml)に懸濁させた。ミキサーで激しくホモジナイズし、ホモジネートを10分間、500×gで遠心分離した。得られた上清中の蛋白質濃度をプロテインアッセイキット(パイオラッド製)で測定し、蛋白質濃度が1%になるように1%酢酸を加え、基質溶液とした。

【0015】② 酵素の選定

グルテンは酸性あるいはアルカリ性条件下で懸濁する故に酵素反応を受けやすくなる。ピロール化反応(N末端環

化反応)はアルカリ性条件下で起こるので、蛋白質を加水分解する酵素として酸性プロテアーゼを用いることとした。酸性プロテアーゼとしてモルシン(シグマ製)、ペプシン(シグマ製)、ラビターゼ(武田化学製)を、それぞれ24時間、37℃で反応させ、生成する水解物の分子量分布をバイオゲル(Biogel) P-2(バイオラッド製)ゲル濾過により測定した。試料50mgを0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)に溶解しバイオゲル(Biogel) P-2カラム(1.6×87.5cm)にのせた。溶出は同じ溶液を用い、流速を19 ml/ 時間に設定した。カラムの排除体積は48mlであった。分子量マーカーには、バシトラシン(MW 1411)、イソロイシルグリシン(MW 188)、イソロイシン(MW 131)を用いた。その結果モルシン水解物が最も低分子化されていることが判った。

【0016】③ 酵素処理

酵素モルシンと基質グルテンを酵素/基質比を1:100、1%酢酸溶媒中で37℃、24時間処理を行った。モルシン処理による水解物は分子量が、大部分1000以上であることから、さらにモルシン水解後、pHを7にし、アクチナ

ーゼB(科研製薬製)を作用させた。反応条件はpH以外は同様とした。得られた水解物をバイオゲル(Biogel) P-2ゲル濾過により測定し図1に示した。図1上部の数値は分子量標準の溶出位置を示す。分子量188付近にピークを示していた。

【0017】④ アクチナーゼ処理条件

アクチナーゼ処理により遊離するアミノ酸を経時的測定し、下記表1に示した。遊離量の高かったアミノ酸は、順に、Gln、Val、Phe、Ileであった。しかし、もとのグルテンから遊離したアミノ酸の割合を各アミノ酸について計算するとGlx 9.6%、Val 83.4%、Phe 67.4%、Ile 74.4%となり、Val、Phe及びIleが67%以上遊離したのに対し、Glnは大部分がペプチド態として残っていることが推定された。このようにアクチナーゼによりGln以外のアミノ酸を選択的に遊離させたためペプチド組成物中のグルタミン含量は原料のグルテンよりかなり上昇する。

【0018】

【表1】

アクリチナーゼ処理によるアミノ酸遊離量^{a)}の経時変化

アミノ酸	反 応 時 間					b 水解物 (H)	c グルテ ン(G)	d 遊離率 %
	0	1	3	7	24	40		
Asp	0.0	0.6	2.2	4.4	11.6	11.6	199.3	68.1
Asn	0.0	23.8	39.0	72.5	107.8	124.3	—	—
Thr	0.0	5.0	13.7	25.0	51.8	81.2	213.9	26.6
Ser	0.0	12.7	40.6	84.5	165.6	165.6	497.2	35.0
Glu	0.0	2.9	4.8	8.3	19.0	30.6	2869.8	9.6
Gln	0.0	36.1	93.7	219.7	222.6	250.9	—	—
Gly	0.0	2.7	7.9	14.6	34.8	59.9	411.5	9.3
Ala	0.0	20.5	54.5	95.2	151.1	151.9	244.8	68.0
Val	0.0	63.4	111.7	152.4	208.2	211.1	260.4	83.4
1/2Cys	0.0	2.4	3.0	3.7	13.4	23.9	108.5	14.2
Met	0.0	59.2	82.1	91.2	96.8	95.6	109.8	89.2
Ile	0.0	66.4	131.9	159.4	163.0	174.6	232.6	74.4
Leu	0.0	35.2	38.6	38.6	41.5	42.6	503.9	30.2
Tyr	0.0	88.2	107.3	129.1	138.4	140.4	188.1	81.9
Phe	0.0	126.6	153.7	175.8	195.8	202.7	351.1	67.4
Lys	0.0	5.4	10.8	16.8	32.4	50.8	134.4	36.7
His	0.0	13.7	29.0	51.6	86.9	101.0	138.1	65.2
Arg	0.0	4.7	10.4	15.8	26.5	26.5	84.3	69.8
Pro	0.0	19.8	32.5	66.7	95.3	126.0	1198.0	8.0
Total	0.0	589.3	967.3	1425.3	1862.0	2162.5	7745.7	28.3

a: 1mgの水解物から得られるn mol
b: セルシン処理による遊離アミノ酸

c: 1mgグルテンのアミノ酸含量
d: (24時間値 + 水解物値) × 100 / グルテン値

【0019】⑤ 遊離アミノ酸の除去

ペプチドから遊離アミノ酸を除くためYamasitaらの方法
(文献: Yamasita et al., J. Food. Sci., Vol 41, 102
9, 1976)に従いセファデックス (Sephadex) G-15(ファ
ルマシア製) カラム(2.5×60cm) ni かけた。溶出は10%
エタノール(pH7)を用い、流速を95ml/ 時間に設定し

た。カラムの排除体積は96mlであった。図2にクロマト
グラムを示した。これにより4画分に分けることができ
た。各画分をそれぞれFr. 1, 2, 3, 4としアミノ酸組成を分
析した結果を下記の表2に示した。

【0020】

【表2】

水解物のアミノ酸組成

(単位: 重量%)

アミノ酸	Fr.1	Fr.2	Fr.3	Fr.4	Gluten
Asx	2.99	2.50	N.D.	N.D.	2.59
Thr	1.79	3.66	0.0	0.0	2.46
Ser	3.28	7.99	12.4	2.8	4.93
Glx	50.33	39.11	63.2	17.5	41.83
Gly	3.63	3.97	N.D.	2.3	2.67
Ala	0.88	4.82	0.0	N.D.	1.98
Val	1.77	7.03	0.0	0.0	2.94
1/2Cys	2.12	0.00	0.0	0.0	1.27
Met	0.37	0.00	0.0	0.0	1.64
Ile	1.63	4.33	0.0	3.0	2.99
Leu	2.25	6.34	24.4	6.4	6.49
Tyr	0.93	0.00	N.D.	0.0	3.49
Phe	2.50	N.D.	N.D.	48.7	5.88
Lys	1.49	3.75	0.0	0.0	1.96
His	1.04	N.D.	0.0	2.6	2.15
Arg	1.97	7.32	0.0	0.0	1.50
Pro	20.82	9.17	N.D.	14.8	12.99
Trp	0.20	—	—	—	0.24

【0021】 Glx 含量はFr.1, 及びFr.3が高かったが、遊離アミノ酸分析の結果Fr.3のGlxの大部分は遊離アミノ酸であることがわかった。一方、Fr.1のGlxの遊離アミノ酸の割合は3.5%であり、大部分がペプチド態であった。またFr.1のGlx含量は原料のグルテンより高かった。

【0022】⑥ N末端グルタミン分析

Fr.1の画分のペプチドのN末端のアミノ酸分析を行った。ペプチドをハートレイ(Hartley)らの方法[バイオケミカル バイオフィジックス アクタ(Biochem. Biophys. Acta.), 21, 58, (1956)]に従いダンシル化し、その後、110℃で24時間加水分解しアミノ酸分析を行った。この時のGlx量、即ちダンシル化されていないGlxをDとした。同量のサンプルをダンシル化した時のGlx量をQとした。N末端に存在するGlxの量をQ-Dとして算出した。Fr.1のN末端に存在するGlxは全Glx中の17.6%であった。水溶液中でも安定なN末端以外の位置に存在するGlxの割合は、全Glx中の78.9%であった(100-3.5-17.6)。Fr.1全体に対するGlxの割合は50.33%であるが、水溶液中でも安定なGlxの割合に換算すると39.71%となる。グルテンを原料としたペプチドは殆どがグルタミンから構成される。

【0023】⑦ ペプチド組成物の分子量分布

Fr.1, 50mgを0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)に溶解しバイオゲル(Biogel) P-2カラム(1.6×87.5cm)にのせた。溶

出は同じ溶液を用い、流速を19ml/時間に設定した。カラムの排除体積は48mlであった。分子量マーカーには、バシトラシン(MW 1411)、イソロイシルグリシン(MW 188)、イソロイシン(MW 131)を用いた。クロマトグラムを図3に示した。ペプチド組成物の中心はテトラ及びペンタペプチドであった。また1mg中のアミノ酸量の絶対値から計算して88%がペプチドまたはアミノ酸であった。収率は窒素基準で原料蛋白質の35%であった。

【0024】

【実験例】

小腸機能に及ぼすグルタミンペプチド投与の影響

本実験例においては、実施例1で得たペプチド組成物の小腸機能に及ぼす効果を実験した例を示す。

① 材料及び方法

飼料組成: β-コーンスターチ(オリエンタル酵母工業)、セルロースパウダー(オリエンタル酵母工業)、大豆油(ナカライテスク製)、塩化コリン(関東化学)、カゼイン(関東化学)、ミネラル、ビタミンを混合して試料を調製した。ミネラル混合物、ビタミン混合物はともにハーバー組成に基づいて配合されたものをオリエンタル酵母工業より購入した。ラットを5群に分け、異なる組成の飼料を7日間ミールフィーディングした。各群の飼料組成を表3に示した。

【0025】

【表3】

飼料組成^a

成分	飼料				
	コントロールグループ	フリーグルタミングループ	グルテングループ	グルタミンペプチドグループ	アミノ酸ミックスグループ
スターチ	30.4	30.4	30.4	30.4	30.4
大豆油	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1
セルロース	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1
ミネラル	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7
ビタミン	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
コリン	0.0625	0.0625	0.0625	0.0625	0.0625
カゼイン	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
グルタミン		1.25			
グルテン			2.83 ^b		
ペプチド				2.83 ^b	
アミノ酸混合物					2.48 ^b
Lys-HCl			0.02	0.02	0.02

a: g/kg/day

b: Gln 換算1.25g

【0026】実験動物: 初体重150gのWistar系雄性ラットをチャールスリバーより購入し、予備飼育後実験に使用した。4日間絶食させて低栄養モデルラットとし、上述の試験飼料を7日間与え、最終投与18~24時間後解剖した。一方、小腸障害モデルラット作成にはメトトレキサート(MTX, 和光純薬)を用いた。上述の試験飼料投与開始から4日目にフォックス(Fox)らの方法[サージカルフォーラム(Surgical Forum)38,43,(1987)]に従ってMTXを20mg/kg腹腔内投与した。その後3日間試験飼料の投与を続け、最終投与18~24時間後に解剖した。日 30
内変動による影響を避けるため、全ラットの解剖は12:00~15:00の間に行った。全ての飼育試験中、水は自由摂取させた。各実験ごとに3~4匹のラットを用いた。各実験群間で、ラットの初体重には殆ど差がなかった。

【0027】小腸: ラットをベントバルビタールナトリウム(大日本製薬製)で麻酔後、開腹し、大動脈を切断することで放血後、小腸を摘出した。内容物を氷冷生理食塩水で洗い流した後、全小腸重量を測定した。上部10cmを除き、次の上部10cmの部分ガラス棒を用いて反転させ、スライドガラスで粘膜を剥離した。剥離した粘膜に19倍量の氷冷生理食塩水を加え、ホモジナイザー(キネマチカ製)で30秒間ホモジナイズ後、3000×g、10分間遠心分離し、上清を次項以下のアッセイに供した。

【0028】粘膜中の蛋白質定量: プロテインアッセイ

キット(バイオラッド製)を用いて測定した。

粘膜シュクラーゼ活性: 0.1M マレイン酸緩衝液(pH6.0)を用いて0.056Mの基質シュクロース水溶液を作成し、その0.1mlに供試液0.1ml及びトルエン1滴を加え、37°C 30分間反応させた。反応終了後、氷冷した蒸留水1mlを加え、沸騰水浴中で2分間加熱した。室温まで冷却した後、生成したブドウ糖量を市販のキット(グルコースC-IIテストワコー, 和光純薬製)によって測定した。酵素活性は $\mu\text{mol sucrose hydrolyzed}/60\text{min}/\text{mg protein}$ 単位で表した。

【0029】粘膜アミノペプチダーゼ活性: 1mMジチオスレイトールを含む100mMリン酸カリウム緩衝液(pH8.0)の存在下、供試液を0.5mM Leu-NAに5分間作用させ、0.4mlの0.23N HClを含むエタノールで反応を停止させた。さらに0.4mlの0.06%p-ジメチルシナムアルデヒドを含むエタノールを加えて30分間放置後、生成するシッフ塩基色素の量を540nmで測定し、遊離した β -ナフチルアミンを定量した。酵素活性は $\Delta\text{As}_{405\text{nm}}/\text{min}/\text{mg protein}$ 単位で表した。測定値の処理: 測定値について1検定を行った。

【0030】② 結果

低栄養ラットの腸機能に及ぼす効果について表4に示した。

【表4】

低栄養ラットの体重変化、小腸重量、粘膜蛋白、小腸酵素活性

	コングロー ル	フリー グルー	グル テ	アミ ノ	グル タ
体重変化 ^a	-6.9±6.1	-3.4±1.4	4.8±5.2	-2.0±11.1	0.9±9.7
小腸重量(g)	2.9±0.3	3.4±0.2	3.4±0.1*	3.4±0.6	3.7±0.3*
粘膜蛋白量 ^b	156±11	166±15	165±15	169±10	179±5*
シユクラーゼ ^c	110±8	101±11	87±17	86±18	96±22
アミノペプチ ダミノーゼ活性 ^d	4.6±0.3	6.0±0.9	5.9±0.9	6.1±0.6	6.0±0.4

a: g/7 日

b: mg/g wet tissue

c: μ mol sucrose hydrolyzed/60min/mg proteind: $\Delta A_{540nm}/min/mg$ protein

*: 5 % の危険率で有意差あり

【0031】低栄養ラットではグルテン添加あるいはグルタミンペプチド添加によつてのみ、体重及び小腸重量の有意な増加が見られた。さらに空腸粘膜中の蛋白質量は、グルタミンペプチド添加群で対照群より有意に上昇したが、同組成のアミノ酸混合物では対照群と有意な差が見られなかった。このことは、本発明ペプチドが小腸

機能を賦活するという点で、アミノ酸混合物よりも優れている。

【0032】MTX ラットの腸機能に及ぼす効果については表5に示した。

【表5】

MTX 処理ラットの体重変化、小腸重量、粘膜蛋白、小腸酵素活性

	正 常	MTX 処 理 群				
		コ ン ト ロ ー ル	フ リ ー G l n グ リ ー ブ	グ ル テ ン グ ル ー ブ	ア ミ ノ 酸 ミ ッ ク ス グ ー ブ	グ ル タ ミ ン ペ プ チ ド グ ル ー ブ
体重変化 ^a 小腸重量(g) 粘膜蛋白量	— 4.9±0.8 146±10	-5.0±3.5 2.8±0.6 103±21	-0.3±6.5 2.6±0.3 126±1	1.0±7.4 3.3±0.7 119±17	1.6±9.9 2.6±0.4 100±8*	0.9±6.3 3.1±0.5 118±4
シュクラーゼ ^c 活性 ^d アミノペプチ ダーゼ活性	57.7±2.1 3.2±0.1	19.4±0.6 2.1±0.1	33.3±6.8* 2.3±0.3	26.9±5.6 2.4±0.2	22.6±3.5 1.9±0.2	36.5±3.9 2.5±0.0

a: g/7 日

b: mg/g wet tissue

c: μ mol sucrose hydrolyzed/60min/mg proteind: Δ As_{400m}/min/mg protein

*: 5 % の危険率で有意差あり

**: 1 % の危険率で有意差あり

【0033】MTX 投与3 日後に小腸柔毛の障害がピークに達し、20mg/kg 投与すると 156時間以内に100 %死亡することが知られている。さらにFox らは遊離態のグルタミン投与によりMTX による障害が有意に抑えられることも報告している [サージカル フォーラム (Surgical Forum) 38, 43, (1987)]. MTX投与により正常ラットと比べ、小腸重量は57% (P<0.05)に、空腸中蛋白質量は71% (P<0.05)に減少し、またシュクラーゼ活性、ロイシンアミノペプチダーゼ活性は0.01%有意で低下した。MTX ラットでは、その約25%が下痢を起こしており、さらに解剖時の所見では、低栄養ラットとは異なり、飼料消化物が胃および腸管に多く残留していた。以上のことから、

MTX により小腸機能が障害を受けていると判定した。

【0034】MTXラットにグルタミンペプチドを投与すると、シュクラーゼ活性は1 %有意で、ロイシンアミノペプチダーゼ活性は5 %有意で上昇した。ほぼ同様の効果が遊離グルタミン添加群で見られたが、アミノ酸混合物では見られなかった。このことは、少なくともMTX 障害モデルにおいてはペプチド吸収系の方がアミノ酸吸収系よりも障害抵抗性があることを示していた。小腸に対するグルタミンの効果は遊離型よりペプチド型の方が大きいことが確認できた。

【0035】

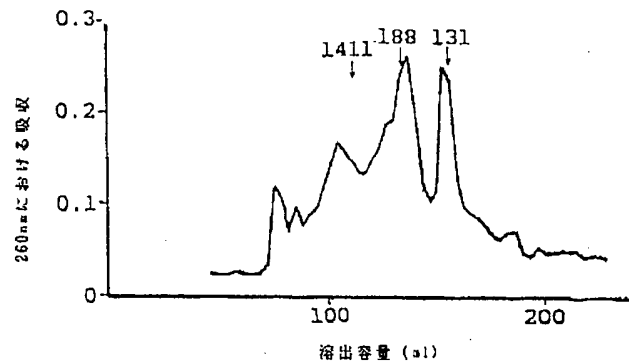
【発明の効果】本発明の実施により、グルタミンを高濃

度に含有するペプチド組成物、及びこれを配合した経腸栄養剤が提供される。本発明で提供されるペプチド組成物はペプチドのN末端のグルタミンが結合していないため、水中でも安定であり、また低栄養などに発生する小腸粘膜の退化を抑制する。また経腸栄養剤として配合された組成物のグルタミン吸収性が向上する。

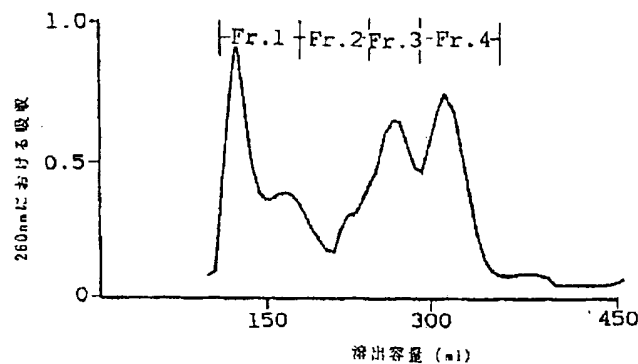
【図の簡単な説明】

【図1】 グルテンの酸性プロテアーゼ酵素分解物をさらにアクチナーゼ処理した溶液のバイオゲル(Biogel) P-2ゲル濾過クロマトグラフィーを示す。260nm 吸光度を測 10

【図1】



【図2】



定し、ペプチド濃度の指標とした。

【図2】 上記溶液からセファデックス(Sephadex)G-15により遊離アミノ酸を除去した液のクロマトグラフィーを示す。260nm 吸光度を測定し、ペプチド濃度の指標とした。

【図3】 本発明のペプチド組成物(図2のFr.1)のバイオゲル(Biogel)P-2ゲル濾過クロマトグラフィーを示す。260nm 吸光度を測定し、ペプチド濃度の指標とした。

【図3】

